Aus dem Robert Koch-Institut
(Direktor: Professor Dr. med. Georg Henneberg)

Drei hämagglutinierende Fraktionen in der Suspension eines Adenovirus (Stamm H/Berlin 192)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
MICHAEL HAMMERSTÄDT
aus Berlin

1968

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier
Referent: Professor Dr. med. Georg Henneberg
Korreferenten: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt
Professor Dr. med. Richard Haas, Freiburg
Professor Dr. med. vet. Manfred Mussgay, Tübingen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin
Promoviert am: 6. Juni 1968

Die Anregung zu der vorliegenden Untersuchung erhielt ich von Herrn Professor Dr. med. Georg Henneberg, Direktor des Robert Koch-Institutes in Berlin.

Für die stets wohlwollende Förderung und die Möglichkeit, die experimentellen Untersuchungen am Institut durchzuführen, spreche ich Herrn Professor Dr. Henneberg meinen ergebensten Dank aus.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548904_0018

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser

Sonderdruck aus dem
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene,
I Orig. **204**, S. 15-32 (1967)
Gustav Fischer Verlag · Stuttgart

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
(Direktor: Prof. Dr. G. Henneberg)

Drei hämagglutinierende Fraktionen in der Suspension eines Adenovirus (Stamm H/Berlin 192)[1]

Michael Hammerstädt

Mit 16 Abbildungen im Text

Eingegangen am 26. Januar 1967

Die Adenoviren vermögen Erythrozyten verschiedener Tierspecies zu agglutinieren. Aufgrund dieser Eigenschaft hat Rosen (1) 1960 diese Viren mittels der Hämagglutination von Rhesusaffen- und Rattenerythrozyten in drei Gruppen eingeteilt.

1958 hatte Rosen (2) gezeigt, daß von 19 untersuchten Adenoviren die meisten nur 1–2 Erythrozytenarten agglutinieren.

1964 stellten Bauer et al. (3) mittels des isopyknischen Gradientenzentrifugierens lösliche und an das Virion gebundene Hämagglutinine dar.

In anderen Untersuchungen von Adenoviren konnten ebenfalls mittels des isopyknischen Gradientenzentrifugierens die Erkenntnisse über den Aufbau der Adenoviren noch erweitert werden (3, 4, 5, 6). Verschiedene Fraktionen der Viren wurden in Dichtegradienten dargestellt und ausgetestet (4, 5, 7, 8,

[1] Als Inaugural-Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

9, 10). Hierbei fanden sich ebenfalls Hämagglutinine in löslicher Form und solche, die an das volle Virusteilchen (Virion) gebunden waren. Dabei konnte auch die Struktur der Virusantigene weitgehend aufgedeckt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hämagglutinine in der Suspension eines von H. Köhler et al. (11) auf primären Schweinenierenkulturen gezüchteten infektiösen Agens untersucht. Das Agens war als Adenovirus typisiert worden und scheint mit keinem der bisher bekannten Adenoviren, insbesondere mit denen von Mensch und Schwein, identisch zu sein (I. Tischer, P. Giesbrecht, H. Köhler. In Vorbereitung).

Es galt festzustellen, ob mehrere hämagglutinierende Fraktionen mit eventuell unterschiedlichen agglutinierenden Eigenschaften gegenüber Erythrozyten verschiedener Species und unterschiedlicher Dichte in Cäsiumchloridgradienten aus der Suspension des Virus darzustellen wären.

Material und Methodik

Virus: Stamm H/Berlin 192: Die Isolierung des Virusstammes erfolgte durch Verimpfen des Serums einer stationär behandelten 23-jährigen Patientin mit infektiöser Hepatitis vom 13. Tag nach Auftreten erster Prodromi auf primäre Zellkulturen aus Nieren gesunder Schlachtschweine (11).

Das Kulturmedium bestand aus Nährmedium 199 (Parker) mit 0,5% durch Seitz EKS Schichten filtriertem Kälberserum (11).

Der Infektionserfolg wurde nach histologischer Aufarbeitung der Zellkulturen mikroskopisch beobachtet (12).

Für die Versuche wurden Zellkulturüberstände höherer Passagen (ab 9.) verwendet.

Das isolierte Virus war als Adenovirus typisiert worden (I. Tischer, P. Giesbrecht, H. Köhler. In Vorbereitung).

Influenza-Virus A/PR 8: das Virus wurde in der Allantoishöhle des bebrüteten Hühnereies gezüchtet, durch Adsorption an Hammelerythrozyten gereinigt und in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (p_H 7,0) aufgenommen.

Reinigung der Virussuspension H/Berlin 192:

Äquivalente Mengen von Virussuspension und kaltem Frigen (Produkt 113) wurden in einem Omni-Mixer (Sorvall®) 1 Minute lang homogenisiert. Der Zeiger des Widerstandes war dabei auf "Powerstat" = 170 eingestellt. Dieser Einstellung entsprach bei stroboskopischer Messung im Leerlauf eine Umdrehungszahl von ca. 12 500 U/min. Während des Vorganges befand sich der Mischbecher im Eisbad. Das Homogenat wurde dann 2 Minuten bei 2 000 U/min zentrifugiert und der wäßrige Überstand erneut mit einer äquivalenten Menge Frigen homogenisiert. Die wäßrige Phase dieses Homogenats wurde bis zur weiteren Verwendung in einem Erlenmeyerkolben aufgehoben. Sämtliche Frigenphasen wurden dann mit ca. 0,25 Vol % Kochsalz-Lösung (gepuffert, p_H 7,0) versetzt und bei ca. 4 000 U/min erneut homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren (5 Minuten bei 3 000 U/min) wurde der wäßrige Überstand den vorher erhaltenen beigefügt. Das homogenisierte Material befand sich dann bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei ca. 4° C.

Isopyknisches Gradientenzentrifugieren

Entwicklung und Entwicklungsstand

Beim Ultrazentrifugieren von Virus in nicht vorgeformten Gradienten stellt sich das Gleichgewicht zwischen Teilchen und Medium erst nach 12 bis 48 Stunden ein (3, 5, 6, 17, 18, 20). Seit einigen Jahren werden indessen Apparaturen benutzt, um geeignete Gradienten vorzuformen (16, 21, 22, 23).

Die Dauer des Zentrifugierens konnte mit Hilfe dieser Geräte auf 3 bis 4 Stunden bei vergleichbaren Ergebnissen verkürzt werden.

Bei Inangriffnahme der vorliegenden Untersuchung standen geeignete Apparate im Institut noch nicht zur Verfügung. Käufliche Geräte gingen wegen ihres Preises und ihres technischen Aufwandes über die Möglichkeiten der vorliegenden Arbeit hinaus.

Ein linearer Gradient gewährleistet bei unbekannter Dichte der zu untersuchenden Teilchen eine bestmögliche räumliche Trennung über die gesamte Gradientensäule. Dies wurde beim Entwurf berücksichtigt. Das Gerät wurde vom Verfasser entworfen und nach seinen Angaben in der Glasbläserwerkstatt des Robert Koch-Institutes Berlin gefertigt, Abb. 1.

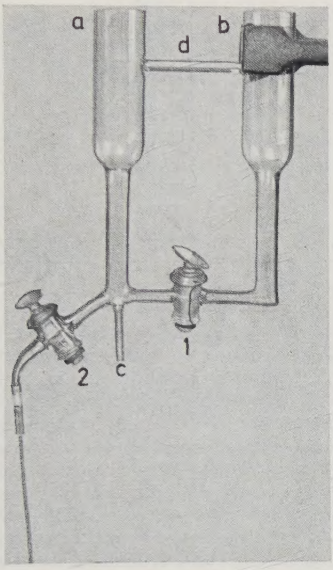

Abb. 1. Apparatur zur Schichtung von Gradienten.

Zwei Glasgefäße a und b von je 12 mm Durchmesser, die sich nach oben auf 29 mm erweitern, wurden mit einem 4 mm dicken Glasrohr verbunden. In der Mitte dieses Rohres zwischen den Glasgefäßen befindet sich ein Hahn 1. Aus dem Glasgefäß a führt ein gebogenes Glasrohr von 4 mm Durchmesser über einen Teflonschlauch in das zu beschichtende Zentrifugenröhrchen. Dieses Glasrohr ist mit einem Hahn 2 versehen.

Das Glasgefäß a hat zum Durchmischen der Flüssigkeit am Boden einen Ansatzstutzen c für eine Luftpumpe (z. B. Aquariumpumpe) oder für eine Stickstofflasche. Beide Glasgefäße wurden zur Erhöhung der Stabilität mit einem Glasstab d verbunden.

Der Hahn 1 wurde so eingestellt, daß die Irritation der Flüssigkeit im Behälter b durch die im Behälter a aufsteigenden Luftblasen möglichst gering war und trotzdem die Kontinuität zwischen beiden Behältern gewährleistet blieb. War der Hahn ganz offen, dann übertrugen sich von den aufsteigenden Luftblasen im Gefäß a Druckschwankungen auf die Flüssigkeit im Gefäß b. Die optimale Stellung des Hahnes 1 wurde durch eine Markierung bezeichnet. Mit Hahn 2 wurde die Dauer des Schichtungsvorganges auf 10 bis 15 Minuten einreguliert und die entsprechende Einstellung an der Hahnfassung markiert.

Der Schichtungsvorgang verlief wie folgt: CsCl-Lösungen in aqua bidestillata wurden in verschiedener Dichte hergestellt. Tabelle 1.

Die schwerere Lösung wurde jeweils in das Glasgefäß b der Apparatur gefüllt, die leichtere in das Gefäß a. Damit das Gewicht beider Flüssigkeitssäulen gleich war, wurden in Abhängigkeit von der Dichte der Lösungen verschiedene Volumina in die Gefäße eingefüllt. Dabei waren sowohl Hahn 1 wie Hahn 2 geschlossen. Dann wurde die Luftpumpe in Betrieb genommen und darauf Hahn 1 bis zur Marke geöffnet. Mit Hahn 2 konnte sodann die Dauer des Schichtungsvorganges reguliert werden. Die verwendeten Zentrifugenröhrchen (Beckmann cellulose nitrate ultracentifuge tubes) faßten 5 ml. Die in die Röhrchen geschichtete CsCl-Lösung hatte ein Volumen von jeweils 3,5 ml.

Tabelle 1

Brechungsindices und spezifische Gewichte prozentualer Lösungen von CsCl in aqua bidest.

g % CsCl in aqua bidest.	n (Brechungsindex)	ρ(g/cm³)
10	1,3405	1,075
20	1,3477	1,150
30	1,3554	1,225
35	1,3588	1,2565
40	1,3622	1,305
50	1,3696	1,375
55	1,3729	1,415
60	1,3762	1,450
70	1,3836	1,525
80	1,3902	1,600
90	1,3980	1,675

Der Gradient sollte den gesamten Dichtebereich der zu untersuchenden Teilchen erfassen. Bei Influenza A/PR 8-Virus z. B. von ρ 1,20 g/cm³ bis ρ 1,30 g/cm³. Dafür war notwendig, Mischungsverhältnisse zu bestimmen, die, in die Glasgefäße der Apparatur vorgegeben, Gradienten in verschiedenen Dichtebereichen entstehen ließen. Es wurden 11 Lösungen ansteigender Dichte von CsCl-Lösung in aqua bidest. hergestellt, (Tabelle 1). Der CsCl-Anteil der bereiteten Lösungen stieg jeweils um 10 g % (zweimal um 5 g %) von 10 auf 90 g % an. Eine 70 g %ige Lösung wurde z. B. mit einer 40 g %igen in die Apparatur gegeben und der entstandene Gradient in die Abb. 2 eingetragen.

Zur Messung des Gradienten wurden die Zentrifugenröhrchen am Boden angebohrt und Fraktionen entnommen. Mittels des Abbé Refraktometers konnte der Brechungsindex der Fraktionen dann leicht gemessen und anhand einer hierfür ermittelten Eichkurve (siehe Abb. 2) die Dichte abgelesen werden.

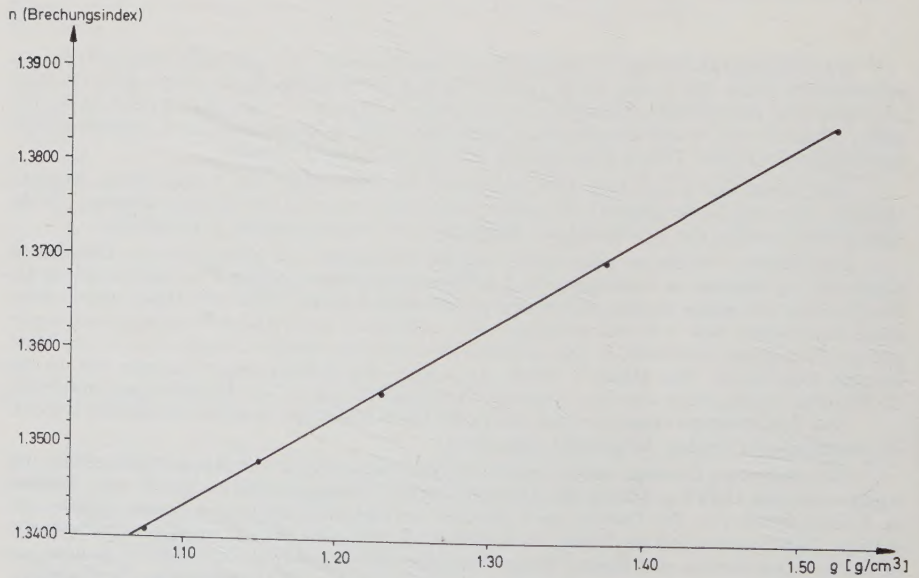

Abb. 2. Eichkurve für Cäsiumchlorid in aqua bidest.: Brechungsindices in Beziehung zur Dichte.

Um die Reproduzierbarkeit der Gradienten darzustellen, mußten die Kurven der Schichtungsvorgänge mit den gleichen Ausgangslösungen miteinander verglichen werden. Dafür war notwendig, daß die aus den beschichteten Zentrifugenröhrchen entnommenen Fraktionen gleiche Volumina besaßen. Der Verfasser hat, um dies zu erreichen, in Anlehnung an die in der Arbeit von SCHAFFER und FROMMHAGEN (24) beschriebene Apparatur ein ähnliches Gerät entworfen. Dieses ist ebenfalls in der Glasbläserwerkstatt des Institutes gebaut worden, Abb. 3.

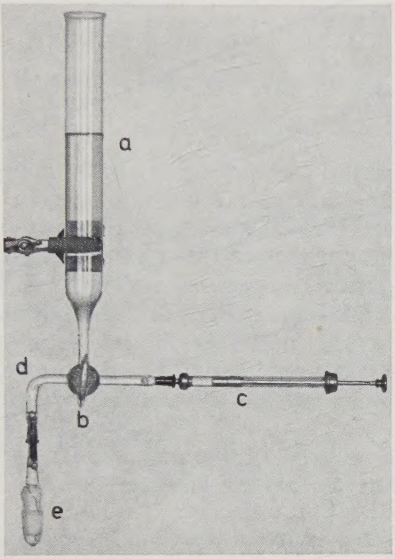

Abb. 3. Apparatur zur präzisen Entnahme von Fraktionen aus 0,5 ml-Zentrifugenröhrchen.

In einem Reservoir a befindet sich Paraffinöl. Über einen Dreiwegehahn b gelangt das Öl in die Tuberkulinspritze c. Wird der Hahn umgeschaltet, so kann das Öl über die Glasleitung d und das Ansatzstück e in das Zentrifugenröhrchen gedrückt werden. Das Ansatzstück wurde auswechselbar gestaltet. Dadurch konnten Zentrifugenröhrchen mit verschiedenen Durchmessern benutzt werden.

Ein Zentrifugenröhrchen mit einem geschichteten CsCl-Gradienten wird mit Paraffinöl aufgefüllt und an das Ansatzstück e bei zum Reservoir offenen Hahn angedrückt. Sind das gesamte System der Apparatur und das Zentrifugenröhrchen vollkommen und blasenfrei mit Paraffinöl gefüllt, so können mittels der Tuberkulinspritze aus dem angebohrten Zentrifugenröhrchen jeweils Proben mit gewünschten Volumina gedrückt werden.

Die Abb. 4 zeigt, daß die Gradienten die geforderten Dichtebereiche erfassen und annähernd linear verlaufen. Beim Gradientenzentrifugieren wurden die Spinco Model L Ultracentrifuge und der SW 39 Rotor benutzt.

Getestet wurde mit dreimal in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Menschen-, Rhesusaffen-, Ratten- und Meerschweinchenerythrozyten. Um im Laufe der Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Erythrozyten-Aufschwemmungen (in gepufferter NaCl-Lösung) auf eine Extinction von 2,3 = ca. 0,5%) bei einer Wellenlänge von 500 mμ eingestellt. Nach P. COHRS et al. (25) liegen die Hämoglobinwerte und die Färbeindices im Blut aller vier Spezies etwa im gleichen Bereich.

Von den zu testenden Suspensionen wurden Verdünnungsreihen mit in Zweierschritten bereiteten Verdünnungen in phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung, beginnend mit der Verdünnung 1:10, hergestellt. Der Test wurde in Röhrchen mit einem lichten Durchmesser von ca. 5 mm ausgeführt. Zu 0,25 ml der Virusverdünnungen wurden 0,25 ml der Erythrozytenaufschwemmung hinzugefügt. Nach einer Inkubation von ca. 1 Std bei 4°C konnten die Teste in der Regel abgelesen werden. Als Titer wurde die Endverdünnung im letzten Röhrchen mit deutlicher Hämagglutination abgelesen.

Zur Bestimmung der optimalen Ablesbarkeit der HA-Teste war in einem Vorversuch bei 4°C, Zimmertemperatur und 37°C (Wasserbad) die Dauer und Güte der Ablesbarkeit der Hämagglutination ermittelt worden (Abb. 5).

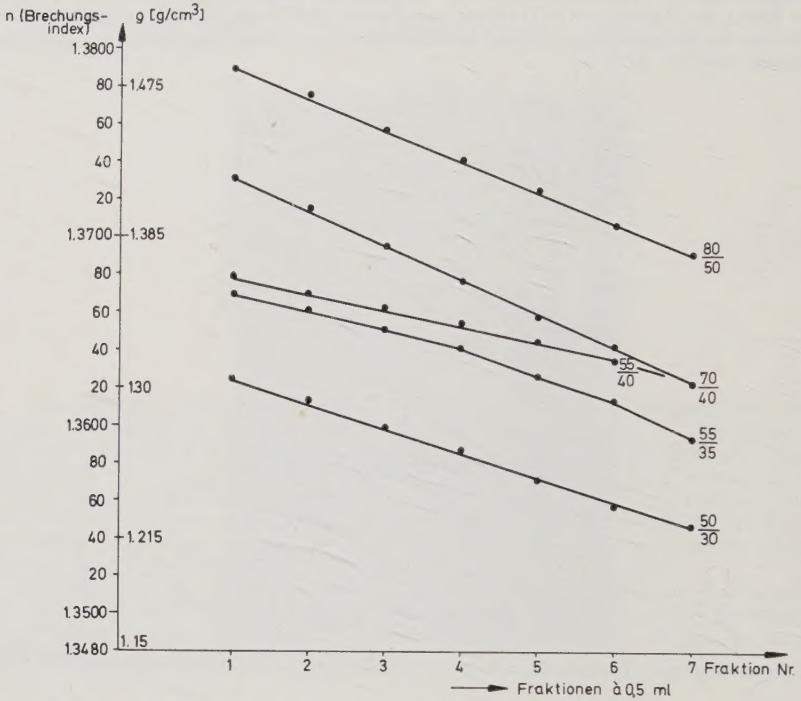

Abb. 4. Verlauf einiger mit der in Abschnitt Material und Methodik beschriebenen Apparatur hergestellten Gradienten. Die Zahlen an den Kurven geben die jeweiligen Mischungsverhältnisse der Cäsiumchlorid-Lösungen in der Apparatur an.

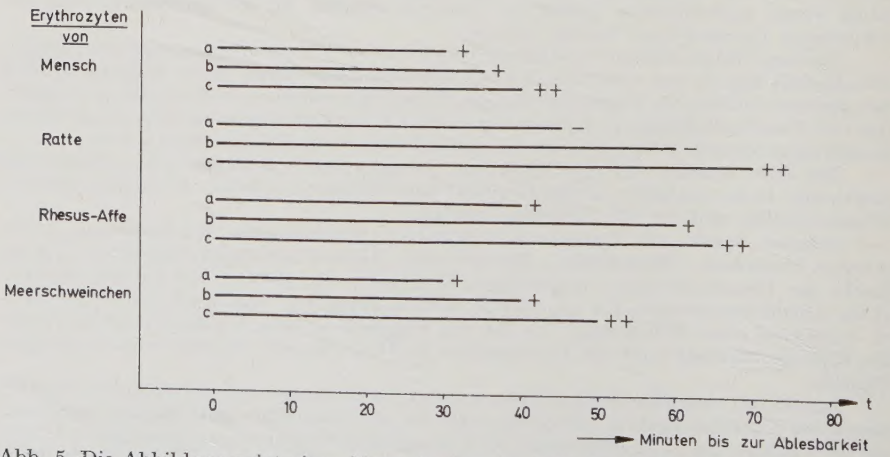

Abb. 5. Die Abbildung zeigt einen Versuch über die Zeit und Güte der Ablesbarkeit der HA-Teste mit verschiedenen Erythrozyten und bei unterschiedlicher Temperatur. Die Zeichen bedeuten: a = Test bei 37°C, b = Test bei 22°C, c = Test bei 4°C. ++ = gut ablesbar, + = weniger gut ablesbar, – = schlecht ablesbar.

Pufferlösung, Dialyse

Für die Dialyse wurde eine Pufferlösung mit einem p_H von 10,5 hergestellt (28): 12,404 g H_3BO_3 + 100 cm³ 1 n NaOH im L = 0,2 M Na-Borat + 47,2 Vol % 0,1 n NaOH = Na-Borat/NaOH-Puffer, p_H 10,5.

Bei der Dialyse erfolgte der Wechsel der Flüssigkeit morgens und abends. Die Dialyse-Flüssigkeit hatte jeweils ca. das 200fache Volumen des zu dialysierenden Materials. Die Dialyse dauerte jeweils ca. 4 Tage.

Experimentelle Ergebnisse

1. Testung der Brauchbarkeit der Schichtungsvorrichtung

In einem Vorversuch wurde zunächst mit Influenza A/PR 8-Virus die Brauchbarkeit der im Abschnitt Material und Methodik beschriebenen Apparatur für die Darstellung von Virus untersucht. Abb. 6 zeigt, daß sich das Virus je nach Verlauf der vorgeschichteten Gradienten mit schmalem oder breiterem Kurvengipfel im gleichen Dichtebereich eingestellt hat. Dabei ist der Kurvengipfel bei flacherem Gradienten breiter, bei steilerem schmaler. Es wurde in diesem Versuch 3 Stunden bei 35 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die Dauer des Schichtungsvorganges (s. unter Methodik) betrug ca. 14 Minuten. Die Kurvengipfel fanden sich mittels des HA-Testes mit Hühnererythrozyten bei einer Dichte von $\rho \approx 1{,}245$ g/cm³.

Dies zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von R. D. Barry (20), der für Influenza Virus eine Dichte von 1,25 g/cm³ angibt.

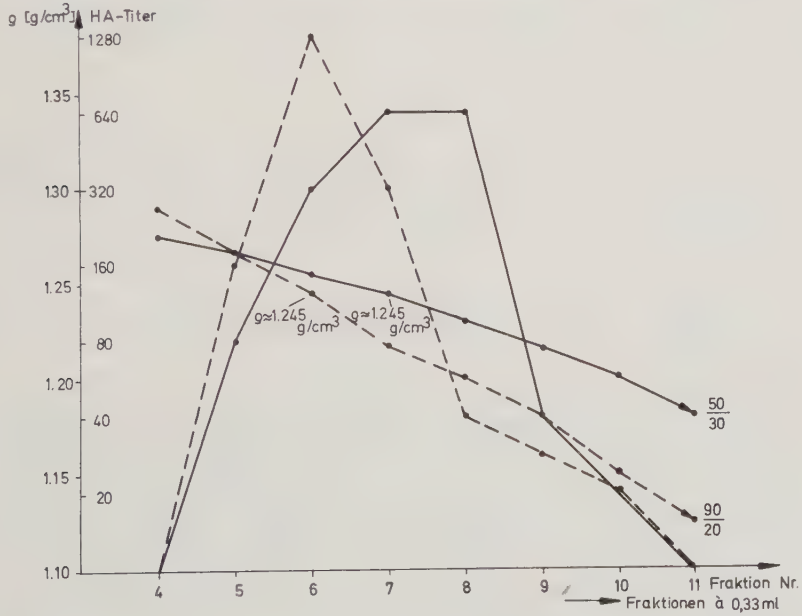

Abb. 6. Influenza A/PR 8 Virus nach dreistündigem Zentrifugieren bei 35 000 U/min. Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Kurvenverläufe vom Verlauf des Gradienten: Ist der Gradient flach, so ist der Kurvengipfel breiter als bei einem steil verlaufenden Gradienten.

Der gleiche Versuch wurde mit anderem Gradientenverlauf und vierstündigem Zentrifugieren bei 35 000 U/min und 4°C wiederholt. Die Gipfel der Kurven lagen auch hier bei einer Dichte von $\rho \approx 1{,}245$ g/cm³, Abb. 7.

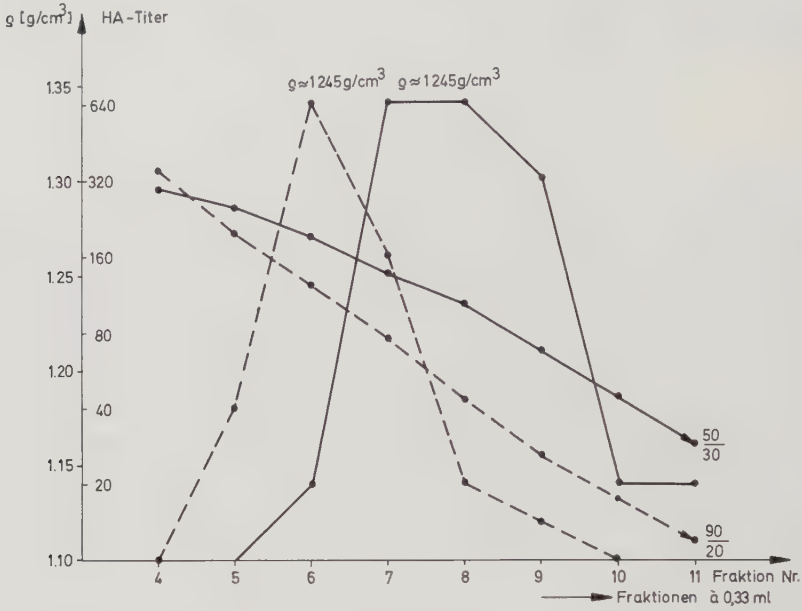

Abb. 7. Influenza A/PR 8 Virus wie in Abbildung 6, jedoch nach vierstündigem Zentrifugieren.

Es zeigte sich im Laufe dieser Untersuchungen, daß eine optimale Einstellung des Antigens in adäquatem Dichtebereich mit sichtbaren Banden nach vierstündigem Zentrifugieren zu erreichen war.

2. Darstellung von hämagglutinierenden Fraktionen aus der Suspension des Adenovirus.

a) Hämagglutinationsspektrum der Antigenfraktionen

In Abb. 8 ist der erste Versuch mit der in dieser Arbeit zu untersuchenden Virussuspension graphisch dargestellt. Nach vorsichtigem Überschichten einer CsCl-Gradientensäule mit 1 ml Virussuspension wurde vier Stunden lang bei 35 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Mittels der beschriebenen Apparatur wurden 12 Fraktionen aus dem am Boden angebohrten Zentrifugenröhrchen entnommen.

Der HA-Test mit Rhesusaffenerythrozyten (Extinction 2,3) ergab zwei Kurvengipfel.

In einem folgenden Versuch konnten die beiden Kurvengipfel bestätigt werden. Sie wurden bei einer Dichte von $\rho \approx 1{,}380$ und $\rho \approx 1{,}315$ g/cm³ gefunden, Abb. 9.

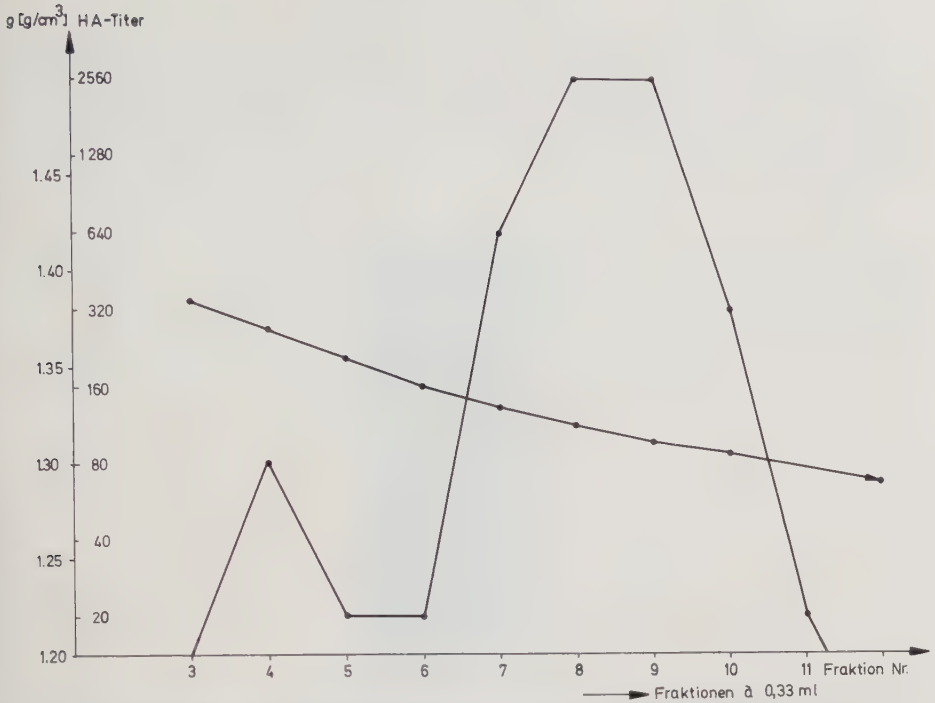

Abb. 8. Die untersuchte Virussuspension nach vierstündigem Zentrifugieren bei 35 000 U/min. Zwei Kurvengipfel wurden im HA-Test mit Affenerythrozyten ermittelt.

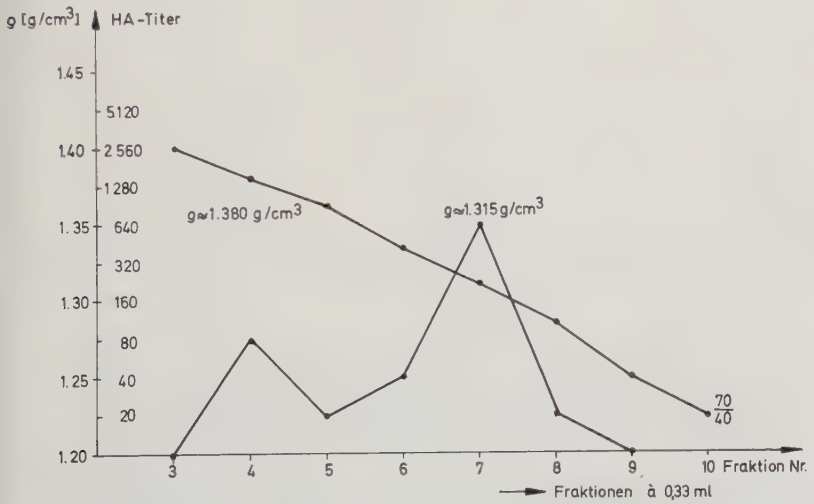

Abb. 9. Die Abbildung zeigt zwei im HA-Test mit Rattenerythrozyten ermittelte Kurvengipfel aus der bei 35 000 U/min zentrifugierten Virussuspension. Die Stabilität des vorgeschichteten Gradienten nach fünfstündigem Zentrifugieren bei 35 000 U/min wird deutlich.

Bei Betrachtung der Röhrchen im durchfallenden Licht waren jedoch *drei* durch ihre Lichtstreuung gut sichtbare Banden zu erkennen, Abb. 10.

Hier und in weiteren Versuchen bewährte sich ein Gradient mit dem Mischungsverhältnis von 70:40 g %igem CsCl in aqua bidest. Dabei waren 2,610 ml CsCl Lösung in den rechten Behälter und 3,050 ml in den linken vorher eingefüllt worden.

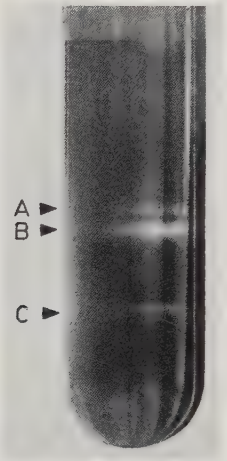

Abb. 10. 3 Banden A, B und C bei $\rho \approx 1{,}300$, 1,335 und 1,380 g/cm³ nach Zentrifugieren von Adenovirus, Stamm H/Berlin 192 bei 35 000 U/min für vier Stunden.

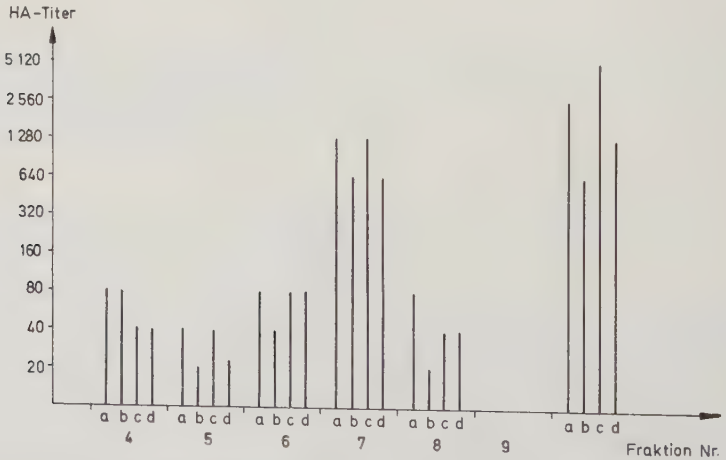

Abb. 11. Links die HA-Titer mit Erythrozyten von vier Species nach fünfstündigem Zentrifugieren bei 35 000 U/min. Es ist ersichtlich, daß alle Fraktionen die Erythrozyten der vier Species agglutinieren. Rechts die HA-Titer der Virussuspension vor dem Zentrifugieren.

a = Meerschweinchen-Erythrozyten; b = Ratten-Erythrozyten; c = Menschen-Erythrozyten; d = Rhesusaffen-Erythrozyten.

Auffallend war nach der Untersuchung der aus dem Röhrchen entnommenen Fraktionen im HA-Test das für Adenoviren ungewöhnlich breite Hämagglutinationsspektrum: Die Antigenfraktionen konnten mit Erythrozyten von Mensch, Rhesusaffe, Ratte und Meerschweinchen gleichermaßen dargestellt werden, Abb. 11.

b) Versuch der schärferen Trennung der Antigenfraktionen durch Entnahme kleinerer Volumina

Es wurde angenommen, daß die in den vorigen Versuchen aus den Zentrifugenröhrchen entnommenen Fraktionen à 0,33 ml zu groß waren, um die beiden Banden A und B (Abb. 10) im HA-Test auch als zwei Gipfel darzustellen. Daher wurden in einem weiteren Versuch, bei dem auch drei Banden zu sehen waren, Fraktionen à 0,10 ml entnommen und mit Rattenerythrozyten (Extinction 2,3) die Hämagglutination ausgetestet.

Es ergaben sich wieder nur zwei Kurvengipfel, wobei der rechte jedoch deutlich breiter als der linke war, Abb. 12.

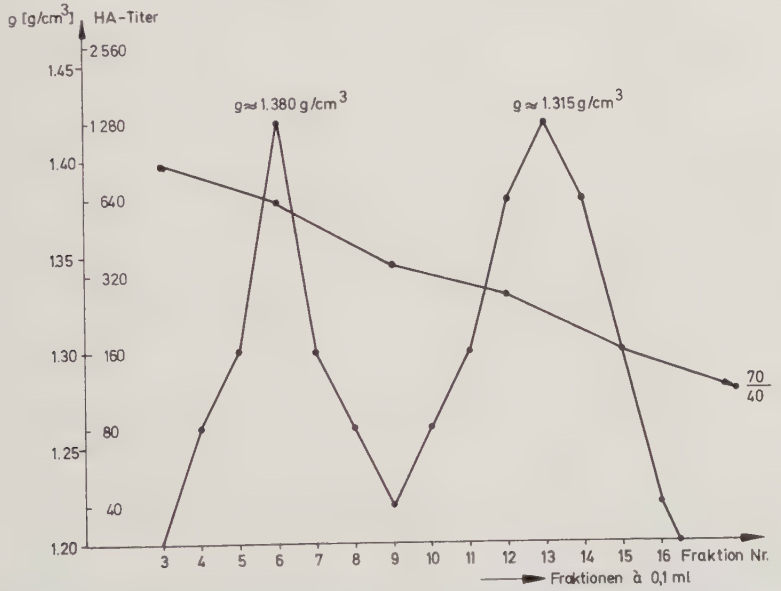

Abb. 12. Die Abbildung zeigt den Versuch, mit kleinen Proben eine bessere Trennung der Kurvengipfel im HA-Test zu erreichen. Der rechte Kurvengipfel ist deutlich breiter als der linke.

Während die Dichte der Bande C in Abb. 10 (linker Gipfel in Abb. 12) vorher verschiedentlich schwankte (von $\rho \approx 1{,}370$ bis $\rho \approx 1{,}385$ g/cm³), wurde als Dichte dieser Bande in diesem und den folgenden Versuchen ein Wert von $\rho = 1{,}380$ g/cm³ ermittelt.

c) Versuch der schärferen Trennung der Antigenfraktionen mit Hilfe eines flacheren Gradienten.

Jetzt wurde versucht, mit einem flacheren Gradienten die beiden oberen Banden (zusammen $\rho \approx 1{,}315$ g/cm³) in zwei im HA-Test nachweisbare Kurvengipfel aufzutrennen.

Der Gradient mit dem Mischungsverhältnis 55:35 g% CsCl in aqua bidest. erwies sich nach entsprechenden Ermittlungen (s. unter Methodik) als geeignet. Der Gradient erfaßte einen Dichtebereich von $\rho \approx 1{,}350$ bis $\rho \approx 1{,}270$ g/cm³, Abb. 4 und 13. In den rechten Behälter der Schichtungsvorrichtung wurden 2,5130 ml und in den linken 2,8300 ml CsCl-Lösung eingefüllt. Die Dauer des Schichtungsvorganges betrug 20 Minuten. Nach Überschichten mit 1 ml homogenisierter Virussuspension wurde 4 Stunden bei 35 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach der Austestung mit Affenerythrozyten (Extinction = 2,3) ergaben sich anstelle des bisherigen Gipfels bei $\rho = 1{,}315$ g/cm³ zwei Gipfel bei $\rho \approx 1{,}300$ und $\rho \approx 1{,}330$ g/cm³, Abb. 13.

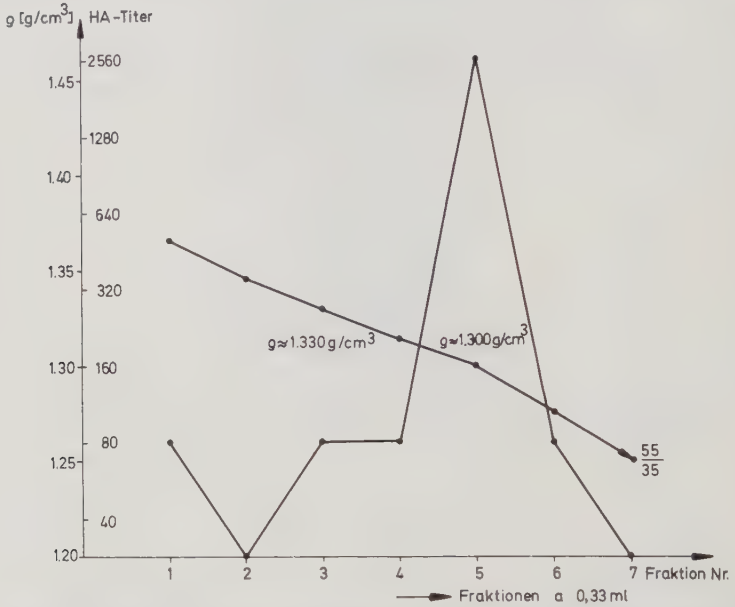

Abb. 13. Zeigt die Auftrennung eines Kurvengipfels (Abbildung 12. Rechter Gipfel) in einen Doppelgipfel mit Hilfe eines flacheren Gradienten (s. a. Abb. 14).

Dieses Ergebnis konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden (s. a. Abb. 14). Hier wurden außerdem statt 0,33 ml je 0,25 ml den Zentrifugenröhrchen als Fraktionen entnommen. Der linke Gipfel konnte damit besser dargestellt werden und hatte die mittlere Dichte von $\rho \approx 1{,}335$ g/cm³.

Die beiden hier getrennten Fraktionen hatten das gleiche Hämagglutinationsspektrum, wie es schon vorher bei der Bande C sowie A und B zusammen (Abb. 10) festgestellt worden war. Damit stand fest, daß alle drei als Banden sichtbaren Fraktionen das gleiche außergewöhnlich breite Hämagglutinationsspektrum aufweisen.

3. Verhalten der drei hämagglutinierenden Fraktionen im Hämagglutinationstest nach Dialyse bei hohem pH

In Anlehnung an die Untersuchungen von Wilcox et al. (4) wurde gereinigte Virussuspension im Dichtegradienten zentrifugiert und die die

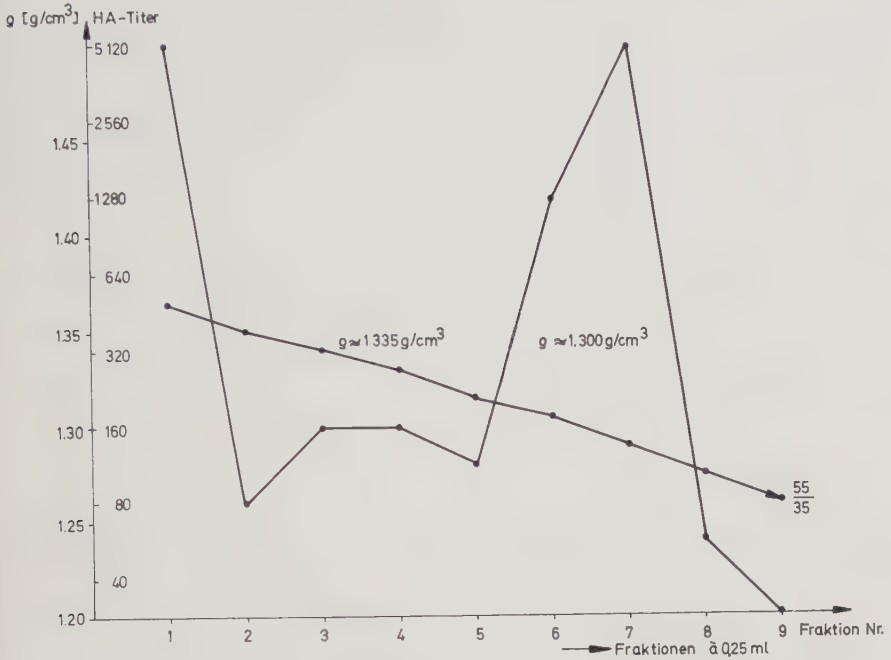

Abb. 14. Darstellung der zwei in Abb. 10 dicht zusammenliegenden oberen Banden im HA-Test, mit Hilfe eines flachen Gradienten und durch Entnahme von kleinen Proben.

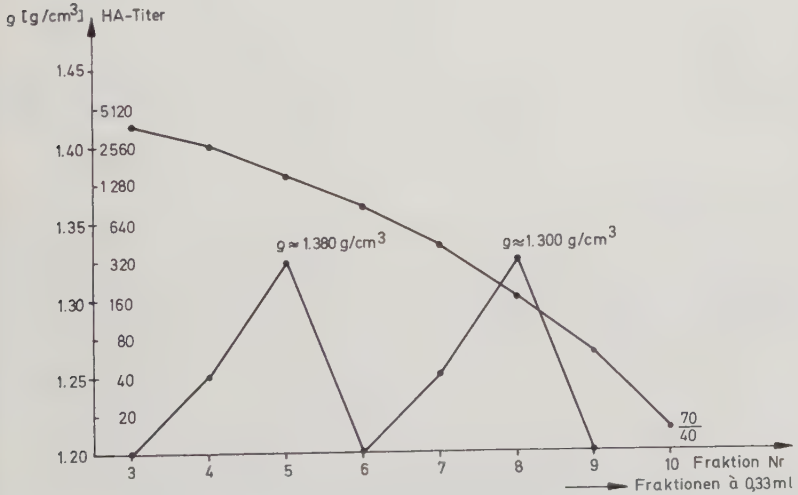

Abb. 15. Zwei im HA-Test ermittelte Kurvengipfel nach Dialyse der Virusfraktionen bei p_H 10,5 und anschließendem Zentrifugieren bei 35 000 U/min/4h.

Antigenbanden enthaltenen Fraktionen vereint und gegen Na-Borat/NaOH-Puffer, pH 10,5, 0,1 M dialysiert. Das dialysierte Material wurde dann in einem Dichtegradienten mit dem Mischungsverhältnis von 70: 40 g%iger CsCl-Lösung 4 Stunden lang bei 35 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Antigen hatte sich statt in drei in zwei deutlich sichtbaren Banden eingestellt. Auch bei der Austestung im HA-Test waren nur zwei Kurvengipfel nachzuweisen. Die Dichte betrug $\rho \approx 1{,}300$ und $\rho \approx 1{,}380$ g/cm³, wobei der Gipfel mit der Dichte $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ dem in Abb. 13 und 14 mit $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ entspricht, Abb. 15.

Nach weiterer Dialyse und bei flacherem Gradienten (55: 35g%ige CsCl-Lösung) konnte der Kurvengipfel bei $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ bestätigt werden. Abb. 16. Aus Abb. 15 und 16 geht hervor, daß nach Dialyse bei hohem pH anstelle des Doppelgipfels in Abb. 13 und 14 nur ein Gipfel bei einer Dichte von $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ verblieben ist und somit die Bande B (Abb. 10) nicht mehr nachweisbar war.

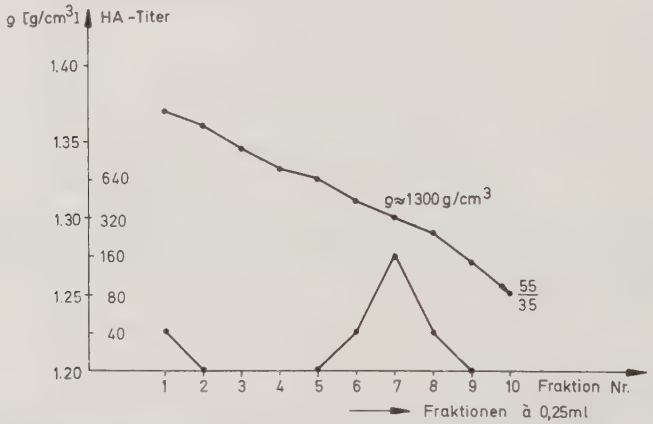

Abb.16. Die Abbildung zeigt das Verbleiben eines Kurvengipfels im HA-Test bei $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ nach Dialyse bei p_H 10,5 und Zentrifugieren bei 35 000 U/min/4 Stunden in einem flachen Gradienten.

Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Die Ergebnisse des Vorversuches bestätigten die Annahme, daß mit der Möglichkeit, den Anstieg und den Bereich der Gradienten zu verändern, eine gute Darstellung des hier untersuchten Adenovirus zu erreichen sei. Nach Bauer et al. (3) erscheint infektiöses Adenovirus in einem Dichtebereich von $\rho \approx 1{,}33$ bis $\rho \approx 1{,}37$ g/cm³. Der Gradient, der in diesem Bereich möglichst flach und linear verlief, erschien zunächst für die hier zu untersuchende Virussuspension am geeignetsten. Die nach vierstündigem Zentrifugieren erhaltenen Ergebnisse bestätigten diese Annahme, Abb. 8, 9, 12, 15.

Dabei wurden 3 Banden sichtbar, wobei die beiden oberen so dicht beieinander lagen (Abb. 10), daß eine Trennung im HA-Test noch nicht möglich war.

Hier fiel auch das Volumen der aus den Zentrifugenröhrchen entnommenen Fraktionen besonders ins Gewicht. Zu klein durften die Fraktionen nicht sein, da Hämagglutination und Brechungsindex bestimmt werden mußten. So konnte auch mit Proben zu 0,1 ml nur gezeigt werden, daß der rechte im HA-Test erhaltene Gipfel (bei $\rho \approx 1{,}315$ g/cm³) breiter als der linke war, Abb. 12. Daraufhin wurde angenommen, daß beide oberen Banden hämagglutinierendes Antigen enthalten könnten. Die mit einem flacheren Gradienten erreichte Auftrennung des rechten Gipfels bestätigte dies, Abb. 13, 14.

Bei der Untersuchung von Adenoviren wurden von verschiedenen Autoren (4, 5, 9, 10, 29) Fraktionen beschrieben, die sich nach Austestung (z. B. serologisch, elektronenoptisch) als Antigene unterschiedlicher Eigenschaften und Struktur erwiesen.

Volles Virus (Virion) und lösliches Hämagglutinin wurden von mehreren Autoren bei verschiedenen Adenovirus-Typen in unterschiedlichen Dichtebereichen gefunden:

Wilcox et al. (4) fanden lösliche Antigene bei $\rho \approx 1{,}2832$ und das Virion bei $\rho \approx 1{,}3349$ g/cm³ (Adenovirus Typ 5). Valentine und Pereira (9) beschreiben lösliche Virusantigene bei $\rho \approx 1{,}3$ g/cm³ (Adenovirus Typ 5). Norrby (10) fand in seinen Untersuchungen (Adenovirus Typ 3) ein volles Virusteilchen bei $\rho \approx 1{,}340$, lösliches Hämagglutinin bei $\rho \approx 1{,}305$ und $\rho \approx 1{,}295$ g/cm³. Mayor et al. (5) fanden lösliches Antigen bei $\rho \approx 1{,}30$ und das volle Virus bei $\rho \approx 1{,}34$ g/cm³ (Adenovirus SV 15).

Es konnte daher auch hier angenommen werden, daß das bei einer Dichte von $\rho \approx 1{,}335$ (bzw. 1,330) g/cm³ (Abb. 13, 14) gefundene Hämagglutinin an das Virion gebunden sei und bei der Dichte von $\rho = 1{,}300$ g/cm³ (Abb. 13, 14, 15, 16) sich lösliches Hämagglutinin befinde.

Wilcox et al. (4 I) haben gezeigt, daß bei der Dialyse von Adenovirus bei hohem pH das volle Virusteilchen in die Komponenten Nukleinsäure und Protein gespalten wird. Elektronenoptisch wurden zwei Strukturen der Proteinkomponente sichtbar (4 II): 1. Hohle polygonale Teilchen, die mit den Viruscapsomeren identisch waren. 2. Faden- oder faserartige Gebilde, die vorher in gereinigten Viruspräparaten auch gesehen worden waren. Dabei herrschten die Capsomeren zahlenmäßig bei weitem vor. Das lösliche Antigen veränderte sich bei der Dialyse nicht.

Danach war zu erwarten, daß in der vorliegenden Arbeit nach Dialyse der drei hämagglutinierenden Fraktionen bei pH 10,5 die mittlere Bande B mit der Dichte von $\rho \approx 1{,}335$ g/cm³ (bzw. 1,330) (= volles Virusteilchen) nicht mehr erscheinen und im HA-Test auch nicht mehr nachweisbar sein würde. Dies konnte auch bestätigt werden: Nachweisbar waren nur noch die Gipfel mit der Dichte $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ und $\rho \approx 1{,}380$ g/cm³. Daraus wurde geschlossen, daß sich bei der Dichte von $\rho \approx 1{,}300$ g/cm³ lösliches hämagglutinierendes Antigen und bei der Dichte von $\rho \approx 1{,}335$ g/cm³ in der hier untersuchten Virussuspension das an das volle Virusteilchen gebundene Hämagglutinin befinde.

Eine besondere Eigenschaft des hier untersuchten Adenovirus zeigte sich in der Hämagglutination von vier Erythrozytenarten:

Bauer et al. (3) hatten 1964 mittels des isopyknischen Gradientenzentrifugierens lösliche und an das Virion gebundene Hämagglutinine trennen können. Dabei fanden sich bei einigen Adenovirus-Typen schon mit

zwei Erythrozytenarten Unterschiede in der Hämagglutination zwischen löslichem und virusgebundenem Hämagglutinin.

Die meisten untersuchten Adenovirus-Typen agglutinieren überhaupt nur eine oder zwei Erythrozytenarten (1, 2). Um so auffallender ist das bei allen drei Fraktionen des hier untersuchten Adenovirus gefundene Hämagglutinationsspektrum.

Es galt jetzt, eine Aussage über die Identität des bei der Dichte von $\rho = 1{,}380$ g/cm³ gefundenen Antigens zu machen.

In den Arbeiten von Mayor et al. (5), Melnick et al. (7), Archetti et al. (8), Hoggan et al. (30), Atchison et al. (31) und Smith et al. (36) wurde ein mit Adenoviren vergesellschaftetes ca. 20 Millimikron großes Teilchen beschrieben. Diese auch AAV (adenovirus associated virus) genannten Teilchen (30, 31) haben nach Hoggan et al. (30) und Melnick et al. (7) je nach Serotyp eine Dichte von $\rho = 1{,}39$ bis 1,43 g/cm³. Nach Smith et al. (36) liegt die Dichte bei $\rho = 1{,}37$.

In der vorliegenden Arbeit gleicht sich das HA-Spektrum des bei $\rho \approx 1{,}380$ gefundenen Antigens vollkommen mit dem des virusgebundenen und des löslichen Hämagglutinins. Mayor et al. (5) nehmen an, daß das von ihnen mit einem Simian-Adenovirus zusammen gefundene kleine polyedrische Teilchen von 20 Millikron Größe mit dem Adenovirus (= sogenanntes "helper virus") erbgutverwandt sei.

Sollte es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen Antigen bei $\rho \approx 1{,}380$ g/cm³ um ein solch kleines Teilchen handeln, würde das gleiche Hämagglutinationsspektrum für diese Verwandtschaft sprechen.

Nach den Untersuchungen von Rosen (1, 2), Bauer et al. (3, 19) und Pereira und Huebner (32) agglutinieren die meisten Adenoviren nur eine oder zwei Erythrozytenarten. Diese Tatsache hat, wie bereits erwähnt, zur Einteilung der Adenoviren in Gruppen geführt. Danach spricht die Gleichheit in der Hämagglutination mit vier Erythrozytenarten dagegen, daß die Banden bei der Dichte von $\rho \approx 1{,}380$ und 1,335 g/cm³ (= volles Virusteilchen) völlig verschiedenartige Antigene sind.

Antigene mit relativ hoher Dichte wurden z. B. auch bei Rhinoviren mit Fraktionen bei $\rho \approx 1{,}307$ und 1,404 g/cm³ (33) oder Small DNA-Viren mit Fraktionen bei $\rho \approx 1{,}31$ und 1,40 g/cm³ (34) gefunden.

Eine bindende Aussage über die bei $\rho \approx 1.380$ g/cm³ gefundene Antigenfraktion kann jedoch nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung noch nicht gemacht werden. So wurden von Smith et al. (35) nach Behandlung von Adenoviren mit Natrium lauryl sulfat (SLS) Bruchstücke gefunden (six capsomere missing pieces), die ähnliche Struktur und Größe wie die kleinen Teilchen haben, die in den oben genannten Arbeiten beschrieben worden sind.

Weitere Untersuchungen, vor allem auch mit Hilfe der Elektronenoptik, werden die Eigenschaften und Struktur des bei der Dichte von $\rho \approx 1{,}380$ g/cm³ gefundenen Antigens aufdecken können.

Zusammenfassung

Die Suspension eines Adenovirus wurde mittels des isopyknischen Gradientenzentrifugierens und des Hämagglutinationstestes untersucht. Dabei konnten aus der Suspension drei hämagglutinierende Fraktionen mit den Dichten $\rho \approx 1{,}300$, 1,335 und 1,380 g/cm³

dargestellt werden. Die Fraktionen waren als Banden zu sehen und zeigten mit Agglutination von Menschen-, Affen-, Ratten- und Meerschweinchenerythrozyten ein einheitliches und für Adenoviren ungewöhnlich breites Hämagglutinationsspektrum.

Der Vergleich mit der Dichte in anderen Arbeiten, die Dialyse bei hohem p_H, anschließendes Zentrifugieren und Austestung im HA-Test führte zu dem Schluß, daß eine Bande aus vollem Virusteilchen, eine andere aus löslichem Hämagglutinin bestand.

Hinsichtlich der Zusammensetzung der dritten Bande mit der höchsten Dichte wird über die in Adenovirus-Suspensionen gefundenen "adeno associated viruses" (AAV) diskutiert.

Three hemagglutinating fractions in an adenovirus suspension

M. Hammerstädt

Investigations on adenoviruses strain H/Nerlin 192 have provided the subject of this paper. The author tried to answer the question fractions drom the above virus suspension which would possibly vary in their hemagglutinating effect on erythrocytes of different animal species. Investigations were carried out by isopycnic gradient centrifugation. A modified layering device reduced the time of centrifugation to 4 to 5 hours. By using isopycnic gradient centrifugation we succeeded in demonstrating three clearly visible bands at $\rho = 1300$, 1335; and 1380. The bands were removed from the tubes in fractions by a self constructed apparatus. They showed an unusually wide for adenoviruses hemagglutination spectrum with agglutination of human, rhesus, guinea-pig, and rat erythrocytes.

A comparison with the density reported in other papers, as well as dialysis at pH 10.5 and subsequently performed hemagglutination test lead the author to the conclusion that at $\rho = 1300$ soluble hemagglutinin was contained and at $\rho = 1.335$ hemagglutinin which was bound to the virion.

In connection with the composition of the bands at $\rho = 1.380$ "adeno associated viruses" (AAV) which recently have been found in adenovirus suspensions are being discussed.

Trois fractions hémagglutinisantes dans la suspension d'un adénovirus (souche H/Berlin 192).

Tres fracciones hemaglutinantes en la suspensión de un adenovirus (cepa H/Berlin 192).

Schrifttum

1. Rosen, L.: A Hemagglutination – Inhibition Technique for Typing Adenoviruses Amer. J. Hyg. **71**, 120–128 (1960).
2. – Hemagglutination by Adenoviruses Virology **5**, 574–577 (1958)
3. Bauer, H., Wigand, R., Adam, W.: Lösliche und virusgebundene Adenovirus Hämagglutinine Z. Naturforsch. **19**b, 587–593 (1964).
4. Structure of Type 5 Adenovirus; I. Wilcox, W. C. und Ginsberg, H. S.: Antigenic Relationship of Virus-Structural Proteins to Virus-Specific Soluble Antigens from Infected Cells. II. Wilcox, W. C., Ginsberg, H. S. und Anderson, T. F.: Fine Structure of Virus Subunits. Morphologic Relationship of Structural Subunits to Virus-Specific Soluble Antigens from Infected Cells. J. exp. Med. **118**, 295–313 (1963).
5. Mayor, H. D., Jamison, R. M., Jordan, L. E. und Melnick, J. L.: Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus (SV 15).J. Bact. **90**, 235–242 (1965).
6. Köhler, Kurt: Gewinnung und Reinigung von Adenovirus Typ 2 mit Hilfe der CsCl Gradientenzentrifugation. Z. Naturforsch. **17**b, 544–547 (1962).
7. Melnick, J. L., Mayor, H. D., Smith, K. O. und Rapp, F.: Association of 20-Millimicron Particles with Adenovirus. J. Bact. **90**, 271–274 (1965).
8. Archetti, J., Bereczky, E. und Bocciarelli, D. St. A Small Virus Associated with the Simian Adenovirus SV 11 Virology **29**, 671–673 (1966).
9. Valentine, R. C. und Pereira, H. G.: Antigens and Structure of the Adenovirus. J. Mol. Biol. **13**, 13–20 (1965).
10. Norrby, E.: The Relationship between the Soluble Antigens and the Virion of Adenovirus Type 3. I. Morphological Characteristics, Virology **29**, 236–248 (1966).

11. Köhler, H., Apodaca, J. und Springer, D.: Über die mehrmalige Isolierung bisher beim Menschen unbekannter Adenoviren aus Patienten mit Virushepatitis mit Hilfe histologischer Verfahren. Zbl. Bakt. Orig. 1967 im Druck.
12. Köhler, H. und Apodaca, J.: Über die Erkennung von Adenovirusinfektionen in Schweinenieren-Primärkulturen mit Hilfe histologischer Verfahren. Zbl. Bakt. Orig. **199**, 338–349 (1966).
13. Beckmann Instruments GmbH, München 45, Frankfurter Ring 115. In München (Deutschland) gedruckt 1962. Eine Einführung in die Dichtegradienten-Zentrifugation.
14. Anderson, N. G.: Studies on Isolated Cell Component. VIII: High Resolution Differential Centrifugation. Exp. Cell. Res. **9**, 446–459 (1955).
15. Meselson, M., Stahl, F. W. und Vinograd, J.: Equilibrium Sedimentation of Macromolecules in Density Gradients. Proc. Nat. Acad. Sci. **43**, 581–588 (1957).
16. de Duve, R. M., Bethet, J. und Beaufay, H.: Gradient Centrifugation of Cell Particulates. Theory and Applications. Progr. Biophys. **9**, 325–369 Pergamon Press (1959).
17. Green, M. und Piña, M.: Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication. IV. Isolation, Purification and Chemical Analysis of Adenovirus. Virology **20**, 199–207 (1963).
18. Mayor, H. D., Jannison, R. M. und Jordan, L. E.: Biophysical Studies on the Nature of the Simian Papova Virus Particle (Vacuolating SV 40 Virus). Virology **19**, 359–366 (1963).
19. Bauer, H. und Wigand, R.: Heterogeneity of Adenovirus Hemagglutinins. Arch. ges. Virusforsch. **12**, 148–151 (Brief Report) (1963).
20. Barry, R. D.: Equilibrium Sedimentation of Influenza Virus in Caesium Chloride Density Gradients. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **38**, 499–508 (1960).
21. Britten, R. J. und Roberts, R. B.: High Resolution Density Gradient Sedimentation Analysis. Science **138**, 32–33 (1960).
22. Bock, R. M. und Ling, N. S.: Devices for Gradient Elution in Chromatography. Analyt. Chem. **26**, 1543–46 (1954).
23. O'Connor, T. E., Rauscher, F. J. und Zeigel, R. F., Bethesda, Md.: Density Gradient Centrifugation of a Murine Leukemia Virus. Science **144**, 1144–47 (1964).
24. Schaffer, F. L. und Frommhagen, L. H.: Similiarities of Biophysical Properties of Several Human Enteroviruses As Shown by Density Gradient Ultracentrifugation of Mixtures of Viruses. Virology **25**, 662–664 (1965).
25. Cohrs, P., Jaffé, R. und Meessen, H.: Pathologie der Laboratoriumstiere, Band I, 1958. Springer-Verlag, Berlin–Göttingen–Heidelberg.
26. Henneberg, G. und Köhler, H.: Praktikum der Virusdiagnostik. Robert Koch-Institut Berlin. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart 1961.
27. Taylor, A. R., Sharp, D. G., Beard, Dorothy, Beard, J. W., Dingle, J. H. und Feller, A. E.: Isolation and Characterisation of Influenza A Virus. (PR 8 Strain). J. Immunol. **47**, 261–282 (1943).
28. Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. Springer-Verlag. Berlin–Göttingen–Heidelberg 1956.
29. Smith, K. O.: Studies on Adenovirus-12. J. Immunol. **94**, 976–989 (1965).
30. Hoggan, M. D., Blacklow, N. R., Rafajko, R. und Rowe, W. P.: Comperative Studies of Adeno-Associated Viruses. Bact. Proc. **6**, 1019–1021 (1966).
31. Atchison, R. W., Casto, B. C., Hammon, W. Mc. D.: Electron Microscopy of Adenovirus Associated Virus (AAV) in Cell Cultures. Virology **29**, 353–357 (1966).
32. Pereira, H. G., Huebner, H. J., Ginsberg, H. S. und van der Veen, J.: A Short Description of the Adenovirus Group. Virology **20**, 613–620 (1963).
33. Dimmock, N. J.: Biophysical Studies of a Rhinovirus. Ultracentrifugation and Electron Microscopy. Nature **209**, 790–794 (1966).
34. Payne, F. E., Beals, Th. F. und Preston, R. E.: Morphology of a Small DNA-Virus Virology **23**, 109–113 (1964).
35. Smith, K. O., Gehle, W. D. und Trousdale, M. D.: Architecture of the Adenovirus Capsid. J. Bact. **90**, 254–261 (1965).
36. Smith, K. O., Gehle, W. D. und Thiel, J. F.: Properties of a Small Virus Associated with Adenovirus Type 4. J. Immunol. 97, 754–766 (1966)

Michael Hammerstädt, Robert Koch-Institut, 1 Berlin 65, Nordufer 20.

Lebenslauf

Am 22. April 1939 wurde ich als Sohn des Heinz Hammerstädt und seiner Ehefrau Käte geb. Redlich in Berlin geboren.

Am 1. März 1960 erhielt ich an der Waldoberschule, neusprachlich-naturwissenschaftliches Gymnasium in Berlin-Charlottenburg, das Reifezeugnis.

Im Sommersemester 1960 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg und setzte es an der Universität Mainz bis zum Sommersemester 1962 fort. Seit dem Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Freien Universität Berlin. Am 11. April 1964 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Von April 1965 bis Anfang 1967 arbeitete ich im Robert Koch-Institut zu Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Georg Henneberg an der vorliegenden Dissertation.

Am 16. September 1967 bestand ich die ärztliche Prüfung.

Seit 1962 bin ich mit Frau Astrid geb. Rößger verheiratet. Ich habe eine Tochter Regina, einen Sohn Wolfgang und einen Sohn Christian.